



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 7 : **A61K** (11) Numéro de publication internationale: **WO 00/30587**
(43) Date de publication internationale: 2 juin 2000 (02.06.00)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02897 (81) États désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).

(22) Date de dépôt international: 24 novembre 1999 (24.11.99)
(30) Données relatives à la priorité: 25 novembre 1998 (25.11.98) FR 98/14836

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf/US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (FR/FR); 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): HIRSCH, François (FR/FR); 20, rue Victor Camille, F-94110 Arcueil (FR); HAERFNER, Aurélien (FR/FR); 14, avenue de Cellis, F-92360 Meudon la Forêt (FR).

(74) Mandataires: DEMACHY, Charles etc.; Grosset-Fournier & Demachy, 20, rue de Maubeuge, F-75009 Paris (FR).

(54) Titre: NF- κ B ACTIVATION INHIBITORS, AND THEIR PHARMACEUTICAL USES

(57) Abstract

The invention concerns the use of the nuclear factor NF- κ B inhibitors for treating cancers, and more particularly malignant haemopathy and solid tumours, as well as product containing a NF- κ B activation inhibitor compound and a cytotoxic molecule capable of activating the NF- κ B factor as a combined preparation for simultaneous, separate or prolonged use for treating said pathologies.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs du facteur nucléaire NF- κ B, dans le cadre du traitement de cancers, et plus particulièrement d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides, ainsi que les produits contenant un composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée, ou étalée dans le temps pour le traitement desdites pathologies.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les États parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovaquie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GB	Grande-Bretagne	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	CA	Canada	MC	Monaco	TD	Togo
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	Moldavie	TG	Togo
BB	Barbade	GR	Grèce	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GU	Guinée	ML	Mali	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	HN	Honduras	MR	Mauritanie	TR	Turquie
BG	Bulgarie	IE	Irlande	MW	Malawi	UA	Ukraine
BJ	Bénin	IL	Israël	MY	Malaisie	UG	Ouganda
BR	Bразил	IS	Islande	NZ	Nouvelle-Zélande	US	États-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	PE	Pérou	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	PG	Papoua-Nouvelle-Guinée	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	RU	Russie	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	SC	Soudan	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KR	Corée	SD	Soudan		
CM	Cameroon	KY	Îles Vierges	SE	Suède		
CN	Chine	LA	Laos	SG	Singapour		
CU	Cuba	LR	Libéria				
CZ	République tchèque						
DE	Allemagne						
DK	Danemark						
EE	Estonie						

INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF- κ B, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES

5 La présente invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs biologiques de NF- κ B, dans le cadre du traitement de cancers, et plus particulièrement d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides.

10 De nombreuses cellules tumorales ont développé des mécanismes sophistiqués leur permettant de résister à l'effet de certains agents utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Une des parades actuelles développées par les cliniciens est l'augmentation du dosage de ces médicaments, avec pour conséquence une aggravation des effets secondaires observés chez les patients. Ainsi par exemple, la plupart des leucémies et certains lymphomes sont traités par l'administration d'anthracyclines (daunomycine, idarubicine) dont la toxicité se manifeste sur des fonctions vitales (hépatique, cardiaque...)

15 (Gauthier, PH, 1987, Gaz Med Fr, 94:43-49).

Le mécanisme d'action de ces médicaments a été bien étudié et aboutit essentiellement à la mort des cellules tumorales par apoptose (Hannun YA, Blood, 89:1845-1853). Pour échapper à l'apoptose, les cellules utilisent une catégorie de protéines codées par des gènes dénommés *multidrug resistant genes* (MDR) qui leur permettent de contrôler l'entrée ou la sortie de différentes molécules (Pastan I, Gottesman MM, 1991, Annu Rev Med, 42:277-286). Dans le cas des agents anticancéreux, ceux-ci sont évacués activement par l'intermédiaire de la P-glycoprotéine (P-gp), produit du gène *MDR1*.

20 Comme tout gène, l'expression des *MDR* est contrôlée par différents facteurs nucléaires. Ainsi, il a été récemment montré que le gène *MDR1* possédait dans sa partie régulatrice des sites de fixation du facteur NF- κ B (Zhou G, Kuo MT, 1997, J Biol Chem, 272:15174-15183). Ce facteur nucléaire, qui par ailleurs joue un rôle considérable dans de nombreuses situations inflammatoires (Barnes PJ, Karin M, 1997, N Engl J Med, 336:1066-1071) participerait à l'activation du gène *MDR1*.

25 Plusieurs travaux récents ont établi un lien entre l'inhibition de l'activation de NF- κ B et la potentialisation de l'apoptose. Dans les premières expériences rapportées (Wang CY et coll., 1996, Science, 272:784-786, Van Antwerp DJ et coll., 1996, Science, 272:787-789) les auteurs ont validé leurs données en utilisant des lignées manipulées génétiquement pour obtenir l'inhibition ou la

surexpression de l'activité NF- κ B. Ceci ne permet donc pas d'en tirer directement des applications thérapeutiques.

5 Dans une autre étude, les auteurs ont testé les effets de différents inhibiteurs de protéases empêchant l'activation de NF- κ B (pyrrolidine dithiocarbamate, N-tosyl-L-lysyl chlorométhylcétone, N-acétyl cystéine) sur une lignée de macrophages murins (Mannick EE et coll., 1997, Mediators of Inflammation, 6:225-232). Les auteurs de cet article concluent sur le lien possible entre l'inhibition de NF- κ B et l'induction de l'apoptose des cellules inflammatoires et immunes.

10 Enfin, une autre approche axée sur l'inhibition des effets inflammatoires de NF- κ B, a consisté à surexprimer l'inhibiteur naturel de NF- κ B, la molécule I κ B, par thérapie génique (Makarov SS et coll., 1997, Gene Ther, 4:846-852). Cette technologie est encore au stade de développement du fait de la complexité de la vectorisation nécessaire à son bon fonctionnement.

15 La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs de nouveaux effets de l'hormone de croissance humaine (hGH), dénommée également somatotropine, à savoir d'une part que l'hGH, et autres composés se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I, sont des inhibiteurs de l'activation de NF- κ B par une molécule cytotoxique, et, d'autre part que l'hGH, et autres composés susmentionnés, permettent de potentialiser les effets de molécules cytotoxiques et donc de réduire les concentrations de ces dernières dans le cadre de traitements thérapeutiques.

20 Tout d'abord, les Inventeurs ont observé que les monocytes humains répondaient moins à une stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) quand ils étaient cultivés en présence d'hGH recombinante exogène. Les Inventeurs en ont conclu que l'hGH inhibait l'activation de NF- κ B après stimulation par les LPS (Haeflner A et coll., 1997, J Immunol, 158:1310-1314).

25 Puis, les Inventeurs ont mis en évidence que les monocytes humains mouraient après le pontage (ou l'engagement) de la molécule de surface APO1/CD95/Fas, et ont montré que l'hGH diminue la mort médiée à travers la molécule Fas, en augmentant la synthèse d'un proto-oncogène antiapoptogène, Bel-2.

30 Enfin, les Inventeurs ont étudié les effets de l'hGH sur la réponse au TNF- α car Fas et le récepteur p55 du TNF- α appartiennent à la même famille des récepteurs de croissance nerveuse. La lignée leucémique promyéloïde humaine U937 a été utilisée pour réaliser ce travail, du fait de l'insensibilité des monocytes humains à la mort médiée par le TNF- α . L'obtention de résultats

inverses à ceux observés avec Fas, à savoir que l'hGH accélère la mort des cellules médiée par le TNF- α , a permis aux Inventeurs de conclure sur l'effet inhibiteur de l'hGH sur l'activation de NF- κ B par le TNF- α ou par d'autres molécules cytotoxiques activant NF- κ B, telle que la daunomycine.

5 Ainsi, la présente invention a pour but de fournir une nouvelle méthode de traitement des cancers, et plus particulièrement des hémopathies malignes et des tumeurs solides, offrant l'avantage d'améliorer à la fois la réponse des malades à certains traitements anticancéreux et également, potentiellement, l'état général du malade.

10 L'invention a également pour but de fournir de nouveaux produits destinés au traitement desdites pathologies, présentant à la fois l'avantage d'augmenter la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie, et celui d'améliorer l'état général des patients. Les nouveaux produits de l'invention permettent de diminuer l'activation du facteur NF- κ B par l'intermédiaire du composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B utilisé, tel que l'hormone de croissance humaine, ce qui est susceptible d'entraîner l'inhibition de la transcription des gènes *MDR* et donc un renforcement des effets cytotoxiques des agents antitumoraux utilisés, avec pour conséquence attendue la diminution du dosage de ces médicaments antitumoraux.

20 L'invention a pour objet l'utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de composés inhibiteurs de NF- κ B, pour la préparation de médicaments destinés à la prévention de l'apparition, ou au traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, ces phénomènes de résistance apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- κ B.

30 Par composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B (encore désignés composés inhibiteurs de NF- κ B), on entend tout composé capable d'inhiber dans les cellules de l'organisme, l'activation de NF- κ B faite par des molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, et donc tout composé capable d'inhiber la synthèse de protéines (telle que la P-gp) permettant aux cellules d'évacuer ces molécules avant qu'elles n'aient pu atteindre leurs cibles moléculaires.

35

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques utilisables dans le cadre du traitement des hémopathies malignes ou des tumeurs solides, lesdites molécules cytotoxiques étant susceptibles d'activer le facteur NF- κ B.

5 Avantageusement, les composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B utilisés dans le cadre de la présente invention, sont des composés se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme. De préférence, lesdits composés sont choisis parmi ceux se liant aux récepteurs susmentionnés dont les séquences en acides aminés des parties transmembranaires, intracytoplasmiques et extramembranaires présentent une homologie d'environ 50 % à environ 70 %.

10 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B tels que définis ci-dessus, choisis parmi l'hormone de croissance, la prolactine, l'érythropoïétine, l'interleukine-4, l'interleukine-7, le G-CSF, le GM-CSF, l'interleukine-3, l'interleukine-6, d'origine humaine ou autres mammifères.

De préférence, lesdits composés sont choisis parmi l'hormone de croissance, ou l'érythropoïétine.

20 A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée :

- de l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,

- ou, avantageusement, de l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.

30 L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

35

L'invention a plus particulièrement pour objet encore l'utilisation susmentionnée de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par (tesdites cellules, et purification..

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un médicament administrable par voie parentérale (IM, IV, SC), notamment à raison :

- d'environ 2 UI/kg de poids corporel/jour dans le cas de l'hormone de croissance humaine,
- d'environ 150 UI/kg de poids corporel/jour dans le cas de l'érythropoïétine humaine.

Parmi les molécules cytotoxiques susceptibles d'activer le facteur NF- κ B utilisées en association avec lesdits composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

Avantageusement, le dosage des molécules cytotoxiques utilisées en association avec lesdits composés est environ 2 à environ 5 fois inférieur au dosage de ces mêmes molécules utilisées seules dans le cadre du traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

A titre d'illustration :

- la posologie journalière usuelle de la daunomycine ou la dauxorubicine étant de 40 à 60 mg/m², la posologie de ces dernières dans le cadre la présente invention est d'environ 5 à 30 mg/m²,

- la posologie journalière usuelle de la vinblastine étant de 5 à 7 mg/m², la posologie de cette dernière dans le cadre la présente invention est d'environ 1 à 4 mg/m²,

- la posologie journalière usuelle de la vincristine étant de 1 à 2 mg/m², la posologie de cette dernière dans le cadre la présente invention est d'environ 0,1 à 1 mg/m²,

- la posologie journalière usuelle du taxol étant d'environ 75 mg/m², la posologie de ce dernier dans le cadre la présente invention est d'environ 15 à 35 mg/m².

Parmi les cancers susceptibles d'être traités dans le cadre de la présente invention, on peut citer principalement :

- les hémopathies malignes telles que leucémies, lymphomes,
- les tumeurs solides telles que celles de l'ovaire, ou du sein.

L'invention a également pour objet tout produit contenant :

- un composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B tel que décrit ci-dessus, et plus particulièrement un composé se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I tels que définis ci-dessus,
- et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

L'invention a également pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention de l'apparition, ou pour le traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- κ B.

L'invention concerne plus particulièrement tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B, l'hormone de croissance, la prolactine, l'érythropoïétine, l'interleukine-4, l'interleukine-7, le G-CSF, le GM-CSF, l'interleukine-3, l'interleukine-6.

Des produits particulièrement préférés dans le cadre de la présente invention, sont ceux comprenant à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B, l'hormone de croissance, ou l'érythropoïétine.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'hormone de croissance humaine telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
 - ou, avantageusement, l'hormone de croissance humaine recombinante telle que décrite ci-dessus, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ou toute séquence peptidique dérivée de la séquence SEQ ID NO 2, et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention a également pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que décrite ci-dessus, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention concerne également tout produit tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, toute molécule choisie parmi les suivantes :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

Des produits tels que définis ci-dessus préférés dans le cadre de la présente invention, sont caractérisés en ce qu'ils contiennent :

- l'hormone de croissance et la daunomycine ou la dauxorubicine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 5 à 30 mg/m² de daunomycine ou dauxorubicine,

- l'hormone de croissance et la vinblastine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 1 à 4 mg/m² de vinblastine,

- l'hormone de croissance et la vincristine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 0,1 à 1 mg/m² de vincristine,

- l'hormone de croissance et le taxol, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 15 à 35 mg/m² de taxol,

- l'érythropoïétine et la daunomycine ou la dauxorubicine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 5 à 30 mg/m² de daunomycine ou dauxorubicine,

- l'érythropoïétine et la vinblastine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 1 à 4 mg/m² de vinblastine,

- l'érythropoïétine et la vincristine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 0,1 à 1 mg/m² de vincristine,

- l'érythropoïétine et le taxol, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 15 à 35 mg/m² de taxol.

L'invention est illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de l'effet *in vitro* de l'hormone de croissance et de l'érythropoïétine sur des lignées cellulaires tumorales.

1) Exemple n°1 :

Un gène de sélection (*neomycin resistant*, Neo^R) et le gène codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH) ont été co-transfectés dans la lignée leucémique promyéloïde humaine U937. En comparant la lignée transfectée U937-hGH (qui produit de façon constitutive l'hGH à des doses physiologiques), soit à la lignée parentale U937, soit à une lignée transfectée avec Neo^R seul, on observe par différentes approches méthodologiques que la lignée U937-hGH meurt davantage sous l'effet du *tumor necrosis factor* (TNF- α). Cette cytokine sécrétée par différents types de cellules immunes possède une activité antitumorale (Harakana, K et coll., 1984, Int J Cancer, 34:263-267) et est capable de promouvoir l'activation de NF- κ B (Baeuerle PA, Henkel T, 1994, Ann Rev Immunol, 12:141-179).

Les cellules U937-hGH et les cellules contrôles U937-Neo ont été mises en culture pendant 48 heures en présence de concentrations croissantes de TNF- α

recombinant. A l'issue de cette culture, les cellules lavées ont été incubées en présence d'iode de propidium qui s'incorpore dans l'ADN des cellules mortes. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

La Figure n°1 montre l'augmentation de l'incorporation d'iode de propidium en fonction des doses croissantes de TNF- α exprimées en unités internationales (UI). Pour les cellules U937 (lignée "mère" ayant servi à obtenir les lignées U937-hGH), avec l'augmentation de la concentration de TNF- α on observe une légère augmentation du pourcentage de cellules fluorescentes (donc mortes) due à l'incorporation d'iode de propidium (fluorescence rouge). Cette figure met par contre bien en évidence le fait que ces valeurs sont beaucoup plus élevées pour la lignée U937-hGH, en fonction des doses croissantes de TNF- α ajoutées au milieu de culture.

Il est ainsi démontré que la présence dans les cultures cellulaires d'hGH produite par les lignées U937 transfectées avec le gène de l'hGH, augmente leur susceptibilité à l'induction de mort médiée par le TNF- α .

2) Exemple n°2 :

Ayant rapporté dans une étude précédente que l'hGH pouvait intervenir dans l'inhibition de l'activation de NF- κ B médiée par les lipopolysaccharides (Haeflner A et coll., 1997, J Immunol, 158:1310-1314), les Inventeurs ont étudié le statut de NF- κ B lors de la stimulation des différentes lignées par le TNF- α .

La Figure n°2 représente le résultat d'une analyse par gel retard. Sur ce gel ont été déposés des extraits nucléaires provenant des cellules U937-hGH et U937 (lignée "mère" ayant servi à obtenir les lignées U937-hGH) soumises à différents inducteurs dont le TNF- α ou le TNF- α et la cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique). Cette expérience indique clairement que la présence de NF- κ B dans les noyaux des cellules U937-hGH est diminuée par rapport aux cellules contrôles.

La présence de NF- κ B est attestée sur les lignes 4 et 5 qui représentent la migration des extraits nucléaires de cellules U937 stimulées par le TNF- α , et pré-incubées, soit avec une sonde froide NF- κ B mutée qui ne déplace pas le signal (ligne 4), soit avec une sonde froide NF- κ B homologue qui inhibe le signal (ligne 5).

La Figure n°3 représente le résultat d'un *enzyme immunoassay* (ELISA) réalisé avec le lysat de cellules U937-hGH et U937-Neo transfectées de façon

transitoire avec un plasmide contenant des séquences NF- κ B dans le promoteur du gène rapporteur codant pour la chloramphenicol-acétyl-transférase (CAT) (Chiao P et coll., 1994, Proc Natl Acad Sci USA, 91:28-32).

Les cellules sont transfectées par électroporation puis incubées avec le TNF- α . A l'issue de la culture, les cellules sont lysées et l'activité CAT est mesurée par un ELISA commercial (Boehringer-Mannheim), selon les recommandations du fournisseur.

La figure montre que l'activité CAT, reflet de la présence de NF- κ B, est diminuée dans les cellules U937-hGH par rapport aux cellules contrôles, après stimulation par le TNF- α .

Les résultats présentés dans les Figures 2 et 3 démontrent donc par deux approches méthodologiques différentes, que la synthèse de NF- κ B est diminuée dans U937-hGH par rapport à la lignée contrôle.

3) Exemple n°3 :

L'utilisation du TNF- α étant très difficile en clinique humaine du fait des effets secondaires adverses, les Inventeurs se sont intéressés à la daunomycine. Cette anthracycline utilisée en thérapie anticancéreuse sous le nom de Cerubidine^R agit en s'intercalant dans les séquences de l'ADN cellulaire, perturbant de ce fait le fonctionnement cellulaire. Tout comme le TNF- α (Bauerle PA, Henkel T, 1994, Ann Rev Immunol, 12:141-179), la daunomycine active NF- κ B (Das KC, White CW, 1997, J Biol Chem, 272:14914-14920).

La Figure 4 indique que la lignée U937-hGH est également plus sensible que la lignée contrôle à la mort médiée par la daunomycine.

4) Exemple n°4 :

Pour tester la possibilité d'utiliser l'objet de la présente invention sur des tumeurs non lymphoïdes, les Inventeurs ont utilisé l'hGH pour essayer d'inverser le phénotype "adriamycine résistant" de cellules isolées à partir d'un adénocarcinome ovarien humain IGROV/ADR (Bénard J et coll., 1985, Cancer Res, 45:4970-4979).

Comme illustré par la Figure 5, ces cellules sont insensibles à l'effet toxique de la daunomycine ajoutée à la culture (groupes hGH 0 ng/ml). L'adjonction d'hGH recombinante (Saizen^R, laboratoire Sero) rend ces

cellules sensibles à la daunomycine, avec un effet maximal observé pour la plus faible dose d'hGH utilisée ici, soit 5 ng/ml.

Ce résultat prouve d'une part que des résultats d'aggravation de mortalité peuvent être obtenus aussi bien avec de l'hGH exogène recombinante qu'avec les lignées transfectées susmentionnées, et que d'autre part, la présente invention peut s'appliquer à des tumeurs solides non lymphoïdes.

5) Exemple n°5 :

L'érythropoïétine (EPO), une autre molécule que hGH appartenant à la même famille des cytokines de classe I, a été testée sur des cellules de carcinome rénal humain (RCC) HIEG.

4.10⁴ cellules RCC ont été transfectées de façon transitoire à l'aide d'un kit Effecten[®], soit avec 3µg d'un plasmide portant le gène codant pour EPO (cellules RCC-EPO), soit avec 3µg d'un plasmide codant pour la résistance à la néomycine (cellules RCC-Neo) comme contrôle négatif. 48 heures après, les RCC ont été mises en présence de daunomycine à deux concentrations différentes : 0,3 et 0,6 µM. Le nombre de cellules survivantes a été mesuré 48 heures plus tard par cytométrie en flux (Figure 6).

Les résultats de l'expérience 1 exprimés en nombre de cellules vivantes sont les suivants :

	RCC-Neo	RCC-EPO
daunomycine 0µM	14745	26911
daunomycine 0,3µM	11382	3487
daunomycine 0,6µM	10179	8551

Les résultats de l'expérience 2 exprimés en nombre de cellules vivantes sont les suivants :

	RCC-Neo	RCC-EPO
daunomycine 0µM	20150	29102
daunomycine 0,3µM	8891	2693
daunomycine 0,6µM	7001	4739

Les résultats montrent que dans deux expériences différentes (expériences 1 et 2), la présence conjointe de daunomycine et d'EPO aggrave sensiblement la mortalité cellulaire, avec un effet plus marqué pour la plus faible dose de daunomycine utilisée.

Légendes des figures :

- Figure 1 : Effet de l'hormone de croissance sur la mortalité des cellules exposées au TNF-α : le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules de la souche U937-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules de la souche U937-hGH ; les concentrations de TNF-α sont indiquées en abscisse en UI/ml.

- Figure 2 : Effet de l'hormone de croissance sur la translocation de NF-κB ; la colonne 1 correspond aux cellules U937 de contrôle, la colonne 2 correspond aux cellules U937 traitées par TNF-α + cycloheximide, la colonne 3 correspond aux cellules U937 traitées par TNF-α, la colonne 4 correspond aux cellules U937 traitées par TNF-α + une sonde NF-κB mutée, la colonne 5 correspond aux cellules U937 traitées par TNF-α + une sonde NF-κB homologue, la colonne 6 correspond aux cellules U937-hGH de contrôle, la colonne 7 correspond aux cellules U937-hGH traitées par TNF-α + cycloheximide, la colonne 8 correspond aux cellules U937-hGH traitées par TNF-α ; la présence de NF-κB est indiquée par une flèche.

- Figure 3 : Effet de l'hormone de croissance sur l'activité rapporteur CAT ; le pourcentage de variation de l'activité CAT est indiqué en abscisse ; les deux colonnes de gauche représentent les deux expériences effectuées sur les cellules U937-Neo, et les deux colonnes de droite représentent les deux expériences indépendantes effectuées sur les cellules U937-hGH.

- Figure 4 : Effet de l'hormone de croissance sur l'apoptose induite par la daunomycine ; le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules de la souche U937-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules de la souche U937-hGH ; les pourcentages indiqués montrent l'augmentation de la mortalité des cellules ; les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en µM.

- Figure 5 : Effet de l'hormone de croissance sur l'apoptose de la lignée IGROV/ADR, induite par la daunomycine ; le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les différentes colonnes correspondant aux différentes concentrations d'hGH utilisées (0, 5, 50, 500, 1000 ng/ml) ; les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en µM.

- Figure 6 : Effet de l'érythropoïétine sur l'apoptose de la lignée de
carcinome rénal humain HIEG, induite par la daunomycine : pour chacune des
expérience 1 et 2, le nombre de cellules vivantes est indiqué en ordonnée, les
colonnes blanches correspondant aux cellules RCC-Neo, les colonnes noires
correspondant aux cellules RCC-EPO ; les concentrations de daunomycine sont
indiquées en abscisse en μM .

5

REVENDICATIONS

1. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation du facteur nucléaire
 κB (NF- κB), pour la préparation de médicaments destinés au traitement des
hémopathies malignes et des tumeurs solides, et à la prévention de l'apparition,
ou au traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques
utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées,
apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont
susceptibles d'activer NF- κB .

10

2. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κB selon la
revendication 1, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des
hémopathies malignes et des tumeurs solides, en association avec une ou
plusieurs molécules cytotoxiques utilisables dans le cadre du traitement des
pathologies susmentionnées et susceptibles d'activer le facteur NF- κB .

15

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, de composés
inhibiteurs de l'activation de NF- κB se liant spécifiquement aux récepteurs
transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme,
tels que les composés choisis parmi l'hormone de croissance ou
l'érythropoïétine.

20

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 :

- de l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à
partir d'extraits hypophysaires, et purification,

25

- ou de l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée
par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence
nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et
étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la
séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de
croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de
vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus,
récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et
purification,

30

- ou de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression
et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2,

35

15

et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

5 5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 :

- de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.,
- ou de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

20 6. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B selon l'une des revendications 1 à 7, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques susceptibles d'activer le facteur NF- κ B choisies parmi :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCF).

25 7. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le dosage des molécules cytotoxiques utilisées en association avec lesdits composés est environ 2 à environ 5 fois inférieur au dosage de ces mêmes molécules utilisées seules dans le cadre du traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

30 8. Produits contenant un composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

16

9. Produit selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B, un composé se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme, choisi notamment parmi l'hormone de croissance ou l'érythropoïétine.

10 10. Produit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification,
- ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

25 11. Produit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.,
- ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4,

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

17

et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF-κB.

12. Produit selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF-κB, toute molécule choisie parmi les suivantes :
- les cytokines,
 - les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
 - les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
 - la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

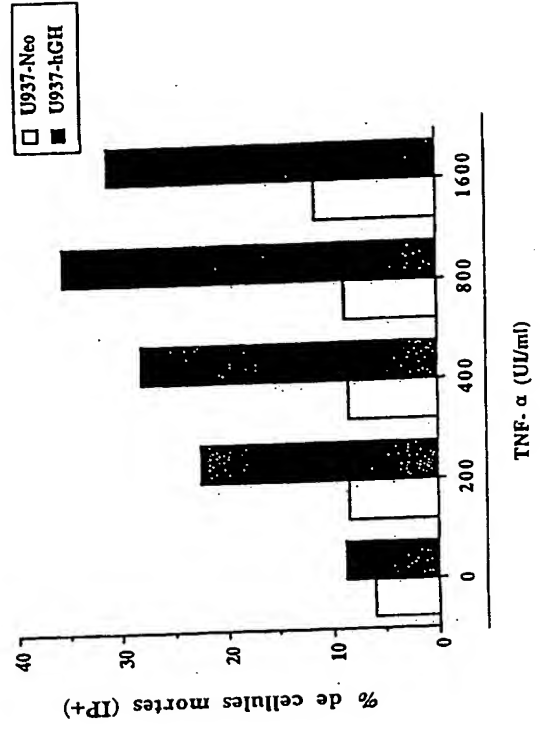


FIGURE 1

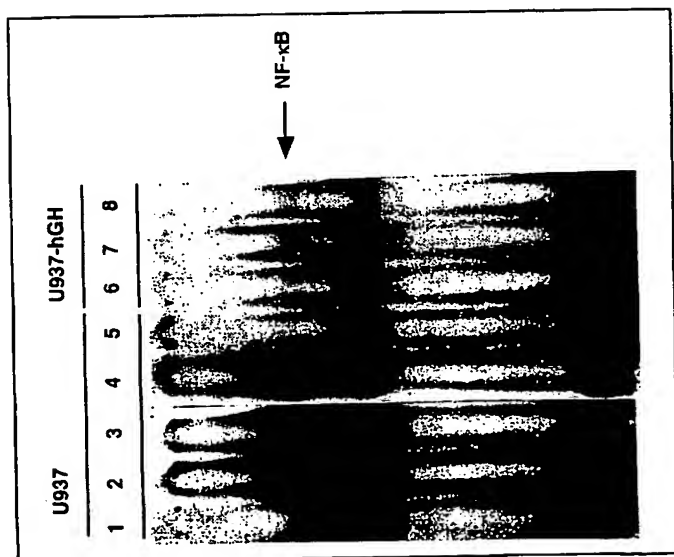


FIGURE 2

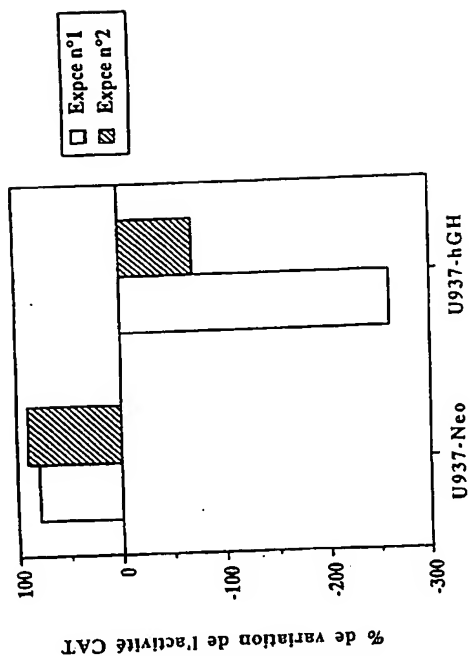


FIGURE 3

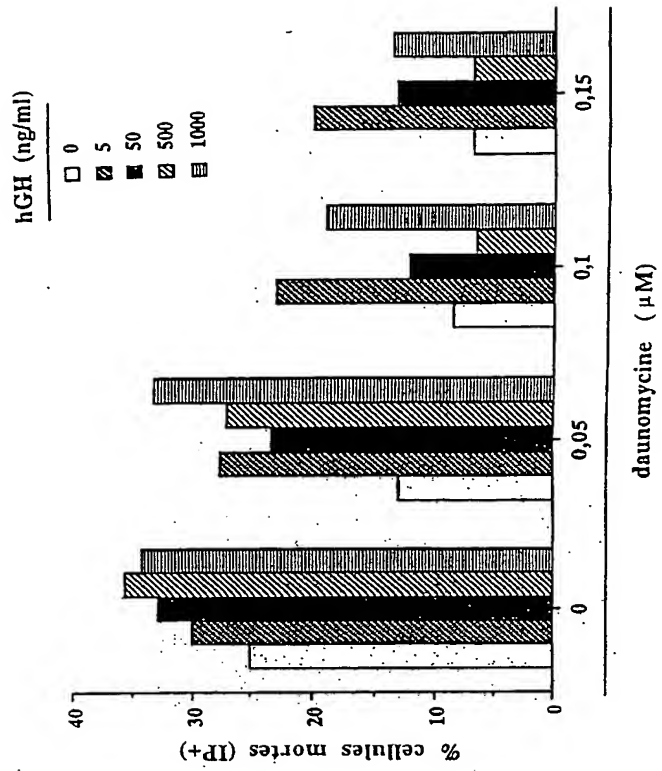


FIGURE 5

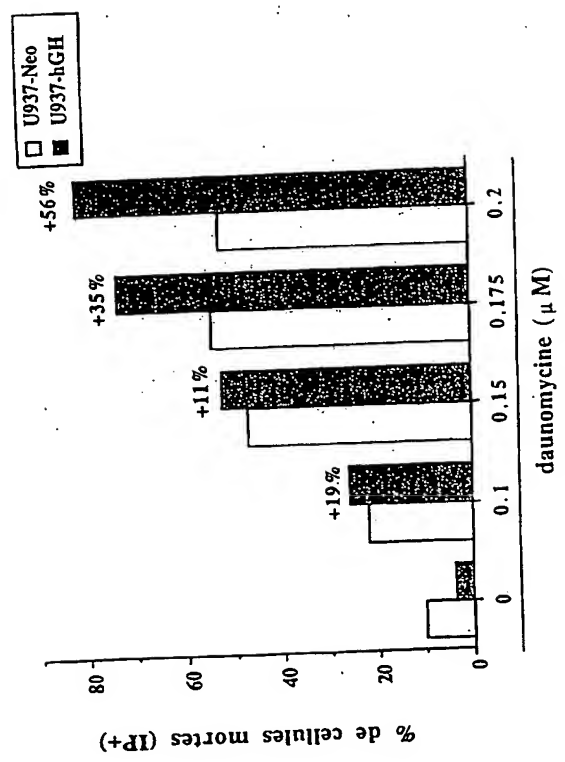
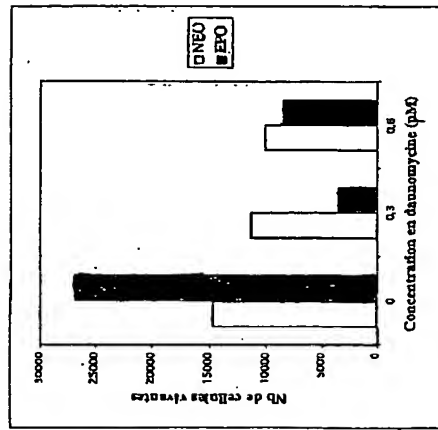


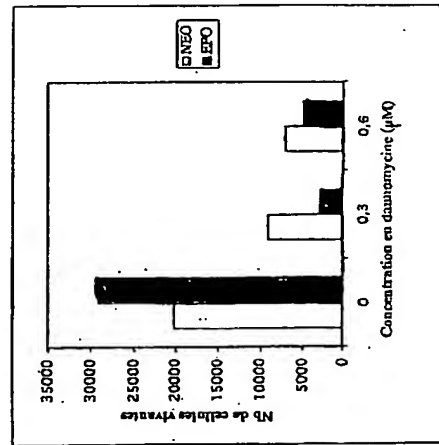
FIGURE 4

Figure 6

Expérience 1



Expérience 2



LISTE DE SEQUENCES

5 (1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- (B) RUE: 3, rue Michel-Ange
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75794 CEDEX 16

10

- (ii) TITRE DE L' INVENTION: INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF- κ B, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OSB)

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 609 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

35

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLB: CDS
- (B) EMBLEMENT: 1..609

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG GCT ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC GCT TTT GGC CTG CTC
45 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

48

TGC CTG CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
20 25 30 35

96

TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT AGT CTC CGC GCC CAT CGT CTG CAC CAG
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
35 40 45

144

55

WO 00/30587

PCT/FR99/02897

WO 00/30587

2		3	
CTG GCC TTT GAC ACC TAC CAG GAG TTT AAC CCC CAG ACC TCC CTC TGT	192	Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln	30
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys		35 40 45	
5			
TTT TCA GAG TCT ATT CCG ACA CCC TCC AAC AGG GAG GAA ACA CAA CAG	240	Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys	60
Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln		50 55	
65			
10 AAA TCC AAC CTA GAG CTG CTC CGC ATC TCC CTG CTC ATC CAG TCG	288	10 Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln	80
Lys Ser Asn Leu Glu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Ile Gln Ser		65 70 75	
85			
TGG CTG GAG CCC GTG CAG TTC CTC AGG AGT GTC TTC GCC AAC AGC CTG	336	Lys Ser Asn Leu Glu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Ile Gln Ser	95
15 Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu		85 90 100 105 110	
GTG TAC GGC GCC TCT GAC AGC AAC GTC TAT GAC CTC CTA AAG GAC CTA	384	Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu	125
Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu		110 115 120 125	
20			
GAG GAA GGC ATC CAA ACG CTG ATG GGG AGG CTG GAA GAT GGC AGC CCC	432	Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu	140
Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro		130 135 140	
130			
CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAG CAG ACC TAC AGC AAG TTC GAC ACA AAC	480	25 Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn	160
Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn		145 150 155 160	
145			
30 TCA CAC AAC GAT GAC GCA CTA CTC AAC TAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC	528	Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys	175
Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys		165 170 175	
165			
TTC AAG AAG GAC ATG GAC AAG GTC GAG ACA TTC CTG CGC ATC GTG CAG	576	30 Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln	185
35 Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln		180 185 190	
180			
TGC CGC TCT GTG CAG GGC AGC TGT GGC TTC TAG	609	Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe *	200
Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe *		195 200	
40			
(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:		(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:	
45	(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:	45	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
	(A) LONGUEUR: 203 acides aminés		(A) LONGUEUR: 582 paires de bases
	(B) TYPE: acide aminé		(B) TYPE: nucléotide
	(D) CONFIGURATION: linéaire		(C) NOMBRE DE BRINS: double
			(D) CONFIGURATION: linéaire
50	(11) TYPE DE MOLECULE: protéine	45	(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: 682	50	(ix) CARACTERISTIQUE:
			(A) NOM/CLÉ: CDS
			(B) EMPLACEMENT: 1..582
			(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu	15	55 ATG GGG GTG CAC GAA TGT CCT GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC CTG	48
1		Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu	
55			

		4		5	
		(B) TYPE: acide aminé		(D) CONFIGURATION: linéaire	
		(11) TYPE DE MOLECULE: protéine		(x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:	
5	Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Ser Leu	1	10	15	
10	Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu	20	25	30	
15	Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu	35	40	45	
20	Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu	50	55	60	
25	Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg	65	70	75	
30	Met Glu Val Gly Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu	85	90	95	
35	Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser	100	105	110	
40	Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly	115	120	125	
45	Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu	130	135	140	
50	Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile	145	150	155	
55	Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu	165	170	175	
60	Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp	180	185	190	
65	Arg *				
70					
75					
80					
85					
90					
95					
100					
105					
110					
115					
120					
125					
130					
135					
140					
145					
150					
155					
160					
165					
170					
175					
180					
185					
190					
195					
200					
205					
210					
215					
220					
225					
230					
235					
240					
245					
250					
255					
260					
265					
270					
275					
280					
285					
290					
295					
300					
305					
310					
315					
320					
325					
330					
335					
340					
345					
350					
355					
360					
365					
370					
375					
380					
385					
390					
395					
400					
405					
410					
415					
420					
425					
430					
435					
440					
445					
450					
455					
460					
465					
470					
475					
480					
485					
490					
495					
500					
505					
510					
515					
520					
525					
530					
535					
540					
545					
550					
555					
560					
565					
570					
575					
580					
585					
590					
595					
600					
605					
610					
615					
620					
625					
630					
635					
640					
645					
650					
655					
660					
665					
670					
675					
680					
685					
690					
695					
700					
705					
710					
715					
720					
725					
730					
735					
740					
745					
750					
755					
760					
765					
770					
775					
780					
785					
790					
795					
800					
805					
810					
815					
820					
825					
830					
835					
840					
845					
850					
855					
860					
865					
870					
875					
880					
885					
890					
895					
900					
905					
910					
915					
920					
925					
930					
935					
940					
945					
950					
955					
960					
965					
970					
975					
980					
985					
990					
995					

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

55 (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 194 acides aminés

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.